

# Aplicações da nanotecnologia na produção de leite

Humberto de Mello Brandão<sup>1</sup>, Fabiano Freire Costa<sup>2</sup>, Saulo Ribeiro da Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pesquisador Embrapa Gado de Leite

<sup>2</sup>Bolsista de posdoutoramento CNPGL

<sup>3</sup>Bolsista CNPGL

## Introdução

Nas últimas décadas, o grande avanço ocorrido na parte de instrumentação laboratorial possibilitou o conhecimento e a compreensão de fenômenos que ocorrem na nanoescala. Nesta condição, uma partícula que tem seu tamanho reduzido para dimensões inferiores a 1000 nm, os fenômenos físicos facilmente visualizados na escala métrica como a gravidade, o atrito, a inércia e outros têm sua importância de ação sobre as partículas diminuídas e, com isso, outras forças físicas, até então diminutas, como é o caso da força eletrostática, de van der Waals, das repulsões estéricas, do movimento browniano e outras passam a imperar. Assim, a partícula pode apresentar suas características aumentadas, ou mesmo, novas características quando comparados a sua forma convencional. Como exemplo, pode-se citar as nanopartículas de ouro que, quando possuem diâmetro médio inferior a 10 nm apresentam coloração vermelho e ao ter seu diâmetro aumentado para dimensões que oscilem entre 10 e 99 nm assumem uma coloração violácea em meio aquoso.

Observações como essa, sinalizaram com grande possibilidade de incremento tecnológico controlando apenas a organização de átomos e moléculas, estimulando assim maciços investimentos em pesquisas envolvendo nanotecnologia nas últimas décadas. Como resultado, tem-se observado o desenvolvimento de produtos inovadores na indústria de eletrônicos, de química fina, medicina, cosméticos e no setor de automação. Os ganhos de conhecimento nesses setores podem facilmente ser adaptados para a indústria de alimentos e contribuir com o desenvolvimento e a melhoria dos atuais equipamentos utilizados para análises de fraudes, contaminantes químicos, biológicos ou mesmo qualificação dos alimentos, os quais podem ser mais rápidos, eficientes e baratos (SOZER e KOKINI, 2009).

Outra aplicação da nanotecnologia inclui os ingredientes ou aditivos nanoestruturados/nanoencapsulados que, dependendo de sua função podem ser adicionados diretamente ao alimento ou a sua embalagem com o intuito de prevenir oxidação, crescimento bacteriano, mascarar o sabor ou a textura do alimento, intensificar o *flavor*, promover a liberação sustentada ou direcionamento de bioativos (vitaminas,

minerais, enzimas, etc) e melhorar a estabilidade ou inibir o crescimento de micro-organismos (FAO e WHO, 2009). Ainda no tema de liberação sustentada ou direcionamento de princípios ativos, a nanotecnologia pode contribuir para desenvolvimento de formulações farmacêuticas inteligentes, que são capazes de combater e prevenir infecções bacterianas, parasitárias, virais ou fúngicas de forma mais eficiente, sem, contudo deixar resíduos no leite.

Nesse contexto, serão abordadas as aplicações da nanotecnologia que podem gerar grandes benefícios para a cadeia produtiva do leite.

### **O leite como fonte de matéria prima para produção de nanoestruturas.**

Todos os alimentos, naturais ou processados, inerentemente contêm nanopartículas. O leite, em especial, frequentemente é citado como um alimento nano, visto que, quase a totalidade de seus componentes apresentam alguma arquitetura ou estrutura em nanoescala. Como exemplo, encontramos as caseínas que possuem diâmetro variando entre 50 e 500 nm e o glóbulo de gordura que em algumas espécies chegam a atingir dimensões inferiores a 1000 nm (GROVES e TITORIA, 2009; SOZER e KOKINI, 2009). Por sua vez, esses componentes podem ser desorganizados e reorganizados em estruturas com tamanhos e funções bem definidas.

Tal condição faz do leite uma excelente fonte de matéria-prima para confecção de nanoestruturas, tanto para uso na indústria de alimentos quanto para a farmacêutica e de cosméticos, cujos novos produtos nanoestruturados não devem sofrer rejeição por consumidores, uma vez que, o leite é rotineiramente utilizado como fonte de alimento em todo o mundo.

O uso de soro de leite como matriz polimérica para confecção de nanopartículas e seu posterior uso em sistemas de liberação sustentada foi proposto por Giroux e colaboradores (2010). Nesse experimento, os autores descrevem a produção de nanopartículas com diâmetro variando entre 100 e 300nm, que são reticuladas covalentemente entre dois grupamentos de cisteínas pela redução do pH.

Por sua vez, Graveland-Bikker e Kruif (2006) descrevem a produção de nanotubos a partir da  $\alpha$ -lactoalbumina parcialmente hidrolisada por proteases do *Bacillus licheniformis*, que sob concentração adequada de alguns cátions di e trivalentes têm seus monômeros autorganizados na forma nanotubos com diâmetro cavitário médio de 8 nm. Esses autores propuseram o uso dessas nanoestruturas como espessantes na indústria de alimentos, como encapsulantes de fármacos e bioativos, como suporte para

crescimento celular na engenharia de tecidos e como fibra.

A  $\beta$ -lactoglobulina, reticulada ionicamente com a pectina foi utilizada por Zimet e Livney (2009) para produção de nanocomplexos capazes de encapsular ácidos graxos polinsaturados da série ômega-3, com grande estabilidade coloidal e transparência. A forma nanocomplexada também apresentou aumento de estabilidade do lipídio quando exposto a oxidação. Esses achados permitiram que os autores aventassem seu uso para o enriquecimento nutracêutico de bebidas.

Nanoesferas produzidas a partir do copolímero caseína-co-dextrina foram utilizadas por Pan e colaboradores (2007) para encapsular o  $\beta$ -caroteno, as quais apresentaram liberação sustentada em condições de simulação do processo digestivo e, aumento de sua estabilidade ante o ensaio de oxidação por  $\text{FeCl}_3$ . A  $\beta$ -caseína foi utilizada para encapsular o mitoxatrone, um quimioterápico hidrofóbico utilizado no tratamento de neoplasias. Na condição encapsulada, o mitoxatrone pôde ser veiculado em formulações aquosas e teve seu efeito tóxico possivelmente reduzido (SHAPIRA *et al.*, 2010).

O recobrimento de nanopartículas de poliácido láctico peguiladas com lactoferrina de colostro bovino foi utilizado para efetuar o direcionamento ativo dessas partículas para o cérebro, visto que, ao se ligarem nos receptores para lactoferrina presentes na barreira hemato-encefálica foram ativamente transportadas e se acumularam no sistema nervoso central (HU *et al.*, 2009).

Outros tipos de nanoestruturas, os lipossomas, são amplamente utilizados em nanotecnologia para liberação sustentada de princípios ativos. Estes são compostos prioritariamente por fosfolípedes, que se auto-organizam formando uma bicamada uni ou multilamelar com um núcleo aquoso central. Segundo Livney (2009), o comportamento anfifílico dos fosfolípedes e das proteínas de membrana dos lóbulos de gordura presentes no leite, lhes confere grande aptidão para produção de lipossomas.

Thompson e colaboradores (2006) compararam lipossomas produzidos a partir de fosfolípedes de membrana do glóbulo de gordura do leite com os produzidos com fosfolípide de soja. Os de origem animal apresentaram módulo da carga elétrica superficial (potencial Zeta) menor que os derivados da soja, sinalizando portanto, menor estabilidade durante períodos de estocagem. Contudo, quando avaliou-se a permeabilidade à água, os oriundos do glóbulo de gordura lácteo foram mais impermeáveis, o que pode lhes conferir um período de liberação sustentada maior quando utilizados para encapsular compostos hidrofílicos.

Assim, o uso de componentes do leite para produção de nanoestruturas de

interesse comercial pode ser mais uma opção de agregar valor ao produto leite.

### **Nanoestruturas para liberação sustentada ou direcionada.**

Além das já abordadas nanoestruturas, as nanopartículas poliméricas produzidas com plásticos biodegradáveis, as magnéticas, as lipídicas sólidas, as metálicas, os fulerenos e nanotubos de carbono também apresentam grande potencial de aplicação para liberação sustentada e direcionamento de fármacos e bioativos.

Alem das aplicações já mencionadas, quando os sistemas nanoestruturados são capazes de fazer o direcionamento de princípios ativos, o efeito sobre a qualidade do leite pode ser imediato, visto que, pode ocorrer redução na quantidade de fármaco empregada no tratamento do animal, ou mesmo este pode apresentar sua biodistribuição alterada.

Ao mudar a biodistribuição, ou reduzir a concentração de um fármaco, este pode não conseguir vencer a permeabilidade seletiva da barreira hemato-glandular (ZIV e SULMAN, 1975). Como consequência, sua excreção no leite pode ser reduzida ou inibida, resultando em menor concentração de resíduos e descarte de leite. Portanto o uso de “dispositivos inteligentes” é uma tendência mundial na medicina humana e animal, não só pela redução dos resíduos mas também pela redução do estresse e da necessidade de manejo animal.

Uma forma elegante de direcionamento ativo de um antibiótico foi a realizada com a gentamicina, para o interior de fagócitos, na qual nanopartículas de poli ácido lático-co-glicólico melhoraram a eficiência do antibiótico no controle da *Brucella spp* (LOCAROZ *et al.*, 2007). Outras nanopartículas com ação semelhante são as de nano-sílica, que também foram ligadas à gentamicina para tratar ratos infectados com *Salmonella enterica* (SLEEN *et al.*, 2009). Em ambos os casos o antibiótico nanoestruturado foi mais efetivo que o convencional.

Outro exemplo de direcionamento são os lipossomas peguizados, que foram utilizados por Schroeder e colaboradores (2008) com o intuito de direcionar o anti-inflamatório esteroideal succinato de metilprednisona para regiões do corpo de ratos que apresentavam processos inflamatórios. Vinte e quatro horas após a administração do sistema nanoestruturado, a concentração de anti-inflamatório no local do processo inflamatório foi o dobro da encontrada na região controle. Tal resultado sugeriu uma potencial redução da dose administrada quando feito o uso de anti-inflamatório nanoestruturado.

A contaminação do leite ou de produtos lácteos, por micro-organismos, também

pode ser reduzida pela liberação sustentada de antimicrobianos. A nisina, um peptídeo com ação antimicrobiana, que é considerado seguro para uso em alimentos pela FAO e pela WHO, foi nanoencapsulado em lipossomas e utilizado para controlar o crescimento de *Listeria monocytogenes* no leite por Malheiros e colaboradores (2010).

### **Nanotecnologia e monitoramento da qualidade do leite.**

Assegurar a qualidade e a inocuidade do leite é fundamental para a segurança do consumidor e do comércio internacional de lácteos. Para esse fim, a nanotecnologia pode contribuir melhorando as atuais técnicas de referência, ou mesmo, colaborando com o desenvolvimento de novos sensores para equipamentos.

As propriedades ópticas ou eletrônicas, derivadas de partículas em nanoescala, quando incorporadas aos ensaios laboratoriais podem aumentar sua sensibilidade. Yuan e colaboradores (2008) acoplaram nanopartículas de ouro de 40 nm a anticorpos contra cloranfenicol, para sua detecção por ensaio de ressonância plasmônica de superfície. As nanopartículas permitiram a amplificação do sinal e com isso atingiram o limite de detecção de 0,74 fg/mL.

O europidium (III) foi ligado a nanopartículas de látex e anticorpos contra *Listeria monocytogenes*. Estas nanoestruturas foram utilizadas em ensaios de TR-FIA para a detecção do patógeno em amostras de queijo, leite, peixe e outros alimentos, mostrando-se quinhentas vezes mais sensível que o ensaio automatizado comercial por EL-FIA (JAAKOHUHTA *et al.*, 2007). Por sua vez, Yang e colaboradores (2007), utilizaram nanopartículas magnéticas de ferrita revestidas com anticorpo anti-*L. monocytogenes* para concentrar as bactérias e com isso facilitar sua detecção por PCR em amostras de leite.

Outros dispositivos que podem ser empregados para detecção de contaminantes de leite são os nanobiossensores, uma classe de sensores nanométricos ou nanoestruturados compostos por componente biológico de elevada especificidade e um transdutor, que converte os sinais biológicos em sinais ópticos, elétricos ou térmicos.

Razzino (2007) produziu um eletrodo de carbono vítreo, ao qual foi incorporado nanotubos de carbono e posteriormente recoberto com acetilcolinesterase. As colinesterases, em geral, são inibidas por organofosforados e carbamatos, dois grupos químicos amplamente utilizados na agropecuária para controle de artrópodes. Quando um desses compostos está presente no analito, a degradação de um substrato (um ester de tiocolina) previamente adicionado é reduzida, alterando assim a corrente elétrica gerada

na reação. Nesse trabalho, a autora conseguiu detectar concentrações de até 8,96nmol L<sup>-1</sup> de carbaril em amostras de tomate.

Fazendo uso de um sistema óptico baseado no tipo wavelength-interroated, que utiliza o princípio de onda evanescente para medir mudanças no índice de refração de um feixe luminoso, Adrian e colaboradores (2009) biofuncionalizaram um microship com biorreagentes específicos (anticorpo, oligonucleotídios e outros) para antibióticos do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos, das sulfonamidas, fluorquinolonas e tetraciclinas, produzindo assim de um nanobiossensor múltiplo. Com este sistema foi possível identificar no leite a presença de trinta e cinco bases farmacológicas diferente pertencentes às classes supra citadas em concentrações de  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Outro grupo de sensores nanoestruturados que podem ser utilizados para avaliação de leite, são os de seletividade global, comumente denominados de língua e nariz eletrônico. Nesses, camadas nanométricas de polímeros como, por exemplo, o poliacetileno, as polianilinas, os polipirrós e outros, podem ser depositados sobre eletrodos por técnicas de automontagem, as quais podem ser submetidas a diferentes dopantes (redutores). Quando expostos aos diferentes líquidos ou voláteis, cada sensor se comporta de uma forma, que ao serem avaliados em conjunto, geram um “espectro” específico de cada analito.

Utilizando sensores do tipo língua eletrônica, De Paula Junior (2009) conseguiu separar leite longa vida (UHT) em função da marca e da concentração de gordura (*i.e.* 0.1, 1 ou 3% de gordura). Tal resultado permite vislumbrar sua aplicação para rastreabilidade. Ademais, nosso grupo já vem efetuando ensaios para detecção de adulteração de leite com soro oriundo da produção de queijo (dados não publicados).

Também, avaliando adulteração em leite, porém de cabra, Dias e colaboradores (2009) conseguiram separar leite de cabra intencionalmente adulterado com leite de vaca em proporção de 50%. Por sua vez, sistemas baseados em língua eletrônica foram utilizados com sucesso para separar o leite proveniente de animais com mastite clínica ou saudáveis (MOTTRAM, *et al.* 2007). Por fim, esses autores aventaram a possibilidade de uso desse sistema para monitoramento *on-line* de rebanhos leiteiros.

## Conclusão

A expansão da nanotecnologia nos mais diversos segmentos de mercado pode ser oportunidade para inserção de derivados do leite na forma nanopartuculada, visto que outras nanopartículas ainda possuem sua segurança de uso questionada. Ademais,

mesmo em uma fase inicial de desenvolvimento, produtos comerciais possuindo nanotecnologia ainda são raros comercialmente, contudo sua incorporação aos diferentes segmentos da cadeia produtiva do leite parece ser uma questão de tempo. Assim o conhecimento de seus potenciais ou limitações é fundamental para a tomada de decisão de sua adoção ou não.

## Referência Bibliográfica

ADRIAN, J.; PASCHE, S.; PINACHO, D. G.; FONT, H.; DISERENS, J.; SANCHEZ-BAEZA, F.; GRANIER, B.; VOIRIN, G.; MARCO, P. Wavelength-interrogated optical biosensor for multi-analyte screening of sulfonamide, fluoroquinolone, b-lactam and tetracycline antibiotics in milk. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 6, 2009.

DE PAULA JUNIOR, A. **Aplicação de uma língua eletrônica para classificação de leite: ALECLE**. 2009. 45p. Trabalho de formatura- Escola Politécnica de Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DIAS, L. A.; PERES, A. M.; VELOSO, A. C. A.; REIS, F. S.; VILAS-BOAS, M.; MACHADO, A. A. S. C. An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk. **Sensors and Actuators B**, v.136, p.209–217, 2009.

FAO/WHO. Expert Meeting on the Application of Nanotechnologies in the Food and Agriculture Sectors: Potential Food Safety Implications. **MEETING REPORT**, 2009, 104p.

GIROUX, H. J.; HOUDE, J.; BRITTEN, M., Preparation of nanoparticles from denatured whey protein by pH-cycling treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 341-346, 2010.

GRAVELAND-BIKKER, J. F.; KRUIF, C. G., Unique milk protein based nanotubes: Food and nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 196-203, 2006.

GROVES, K.; TITORI, P. Nanotechnology and the food industry. **Food Science and technology**, v. 23, n. 2, p. 18-20, 2009.

HU, K.; LI, J.; SHEN, Y.; LU, W.; GAO, X.; ZHANG, Q.; JIANG, X., Lactoferrin-conjugated PEG–PLA nanoparticles with improved brain delivery: In vitro and in vivo evaluations. **Journal of Controlled Release**, v. 134, p. 55-61, 2009.

JAAKOHUHTA, S.; HÄRMÄ, H.; TUOMOLA, M.; LÖVGREN, T. Sensitive Listeria spp. immunoassay based on europium(III) nanoparticulate labels using time-resolved fluorescence. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 288–294, 2007.

LIVNEY, Y. D., Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 2009.

LOCAROZ, M.C.; BLANCO-PRIETO, M.J.; CAMPANERO, M.A.; SALMAN, H.; GAMAZO, C. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) particles containing gentamicin: pharmacokinetics and pharmacodynamics in Brucella melitensis-infected mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n.4, p.1185-90, 2007.

MALHEIROS, P. S.; DAROIT, D. J.; DA SILVEIRA, N. P.; BRANDELLI, A. Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of Listeria monocytogenes in milk. **Food Microbiology**, v. 27, p. 175–178, 2010.

MOTTRAM, J.; RUDNITSKAYA, A.; LEGIN, A.; FITZPATRICK, J. L.; ECKERSALL, P. D. Evaluation of a novel chemical sensor system to detect clinical mastitis in bovine milk. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 2689–2693, 2007.

PAN, X.; YAO, P.; JIANG, M., Simultaneous nanoparticle formation and encapsulation driven by hydrophobic

interaction of casein-*graft*-dextran and  $\beta$ -carotene. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 315, p. 456-463, 2007.

RAZZINO, C. A. **Desenvolvimento, caracterização e utilização de um nanobiossensor enzimático para a determinação de carbaril**. 2007. 80p. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

SCHROEDER, A.; SIGAL, A.; TURJEMAN, K.; BARENHOLZ, Y. Using PEGylated nano-liposomes to target tissue invaded by a foreign body. **Journal of Drug Targeting**, v. 16, n.7, p. 591–595, 2008.

SHAPIRA, A.; ASSARAF, Y. G.; LIVNEY, Y. D., Beta-casein nanovehicles for oral delivery of chemotherapeutic drugs. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 119-126, 2010.

SOZER, N.; KOKINI, J. L., Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, v.27, N.2, 2009.

THOMPSON, A. K.; HINDMARSH, J. P.; HAISMAN, D.; RADES, T.; SINGH, H., Comparison of the Structure and Properties of Liposomes Prepared from Milk Fat Globule Membrane and Soy Phospholipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 3704-3711, 2006.

YUAN, J.; OLIVER, R.; AGUILAR, M.; WU, Y. Surface Plasmon Resonance Assay for Chloramphenicol. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 8329–8333, 2008.

ZIMET, P.; LIVNEY, Y. D., Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids. **Food hydrocolloids**, v. 23, p. 1120-1126, 2009.

ZIV, G.; SULMAN, S. G. Absorption of antibiotics by the bovine udder, **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 11, 1975.